

【ミニレビュー】

食物アレルギーと糖タンパク質糖鎖

Food allergens and sugar chains linked to glycoproteins

木村 吉伸

Yoshinobu KIMURA

要 旨

植物性食品には様々な種類の糖タンパク質が含まれている。これらの糖タンパク質の中には、特定のアスパラギン残基に植物特異的な糖鎖（*N*-グリカン）が共有結合しているものがあり、これらの植物糖鎖は哺乳動物に対して抗原性が高いことが知られている。種子タンパク質のアレルゲンや花粉アレルゲンはこのような抗原性糖鎖を持つ糖タンパク質である場合が多く、これらの抗原性糖鎖がアレルギー反応の発現に関与するIgEに対するエпитープである可能性が推測されていた。これらの植物抗原性糖鎖は交差反応性糖鎖決定基（CCD）と呼ばれ、現在ではアレルギーの発症には直接関与しないと考えられている。しかし、遊離型の（タンパク質と結合していない）植物抗原性*N*-グリカンには抗アレルギー活性がある可能性が示唆されている。

Abstract

Foods contain various types of glycoproteins. Some of these glycoproteins carry plant-specific glycans (N-glycans) covalently linked to specific asparagine residues, and it is well known that these plant glycans are highly antigenic to mammals. Seed-protein allergens and pollen allergens are often glycoproteins with these antigenic glycans, and it has been speculated that those antigenic glycans linked to allergenic food glycoproteins or pollen allergens may be epitopes against IgE, which is involved in the onset of allergic reactions. These plant antigenic glycans are called cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs) and are now considered not to be directly involved in the pathogenesis of allergy. It has been suggested, however, that free (non protein-bound) plant antigenic N-glycans may have antiallergic activity.

1. はじめに

真核生物が産生する分泌型タンパク質や細胞膜タンパク質の多くは、オリゴ糖が共有結合した糖タンパク質として存在している。特に、Asn-X-Ser/Thr（X≠Pro）配列中のAsn残基に結合するアスパラギン結合型糖鎖（*N*-グリカン）は、カビや酵母から動植物に至るまでの進化過程で保存されており、様々なタンパク質の生体内機能に重要な役割を担っている。哺乳動物の場合、糖タンパク質に結合する糖鎖は細胞分化、組織構築、さらには様々な疾患（がんやウイルス感染）にも関係することから、1970年代後半から様々な糖タンパク質糖鎖の構造・機能相関に関わる研究が精力的に行われてきた。最近では、糖鎖関連遺伝子（糖鎖生合成や分解に関与する酵素群、レクチン群など）のノックアウト技術やゲノム編集技術の進歩により、これまで原因が不明であった重篤な疾患の幾つかが糖鎖不全（糖鎖構造が健常人のそれらと異なる）により惹起されていることが明らかになっている。また、細胞表面や分泌タンパク質に結合する糖鎖の構造が細胞のがん化によって変化することから、それら糖鎖は人間ドックなどで腫瘍マーカーとして利用されている^{1, 2)}。更に免疫に関わる事例の一つとして、ヒトの血液型が細胞表面の糖鎖構造の違いによることは現在ではよく知られている³⁾。

糖タンパクを食品化学の観点から眺めると、当然のことではあるが、食材あるいは料理のほとんど



哺乳動物と高等植物では、それらが産生する*N*-グリカンの構造特性に幾つかの違いが見られ、それらの化学構造の差異が植物糖鎖に抗原性を付与することになる。それらの差異はゴルジ装置内で機能する糖鎖合成酵素（糖転移酵素）の基質特異性の違い、つまり糖転移酵素群の遺伝子の違いに起因する。その一方で*N*-グリカンの生合成機構には真核生物に共通のコンテキストが存在するため、構造多様性の中にも共通のトリマンノシルコア構造（Man3GlcNAc2-Asn、Man, マンノース；GlcNAc, *N*-アセチルグルコサミン；Asn, アスパラギン）が見られるなど、動植物に共通に存在する構造も多く存在する。哺乳動物と高等植物が産生する*N*-グリカンの代表的な構造を図2に示す。哺乳動物の複合

型構造は極めて多様性が高いので、2例をあげるにとどめるが、基本的には（１）非還元末端にシアル酸残基（粘性を与える酸性糖）が存在する場合が多い（２）ガラクトース（Gal）残基は β 1-4結合でGlcNAc残基に結合するが多い（３）還元末端GlcNAc残基へのフコース（Fuc）残基の結合が α 1-6結合である（４）バイセクトGlcNAc残基がコア構造中の β -Man残基に結合する場合がある（５）2本鎖構造以外にも3～5本鎖構造が存在するなどが哺乳動物N-グリカンの構造的特徴である。一方、植物N-グリカンには前述したように（１）コア構造中の β -Man残基に β 1-2キシロース（Xyl）残基が結合し、還元末端GlcNAc残基に α 1-3Fuc残基が結合する（２）非還元末端側にルイス a（Lewis a, Lea）抗原（Gal β 1-3（Fuc α 1-4）GlcNAc）が存在する場合があり、Gal残基は β 1-3結合でGlcNAc残基に結合する（３）3～5本鎖構造やシアル酸を有する構造は見出されていない等の特徴がある¹⁴⁾。構造多様性の観点からすると、植物N-グリカンは動物N-グリカンに比べると構造バラエティーはそれほど多くはない。

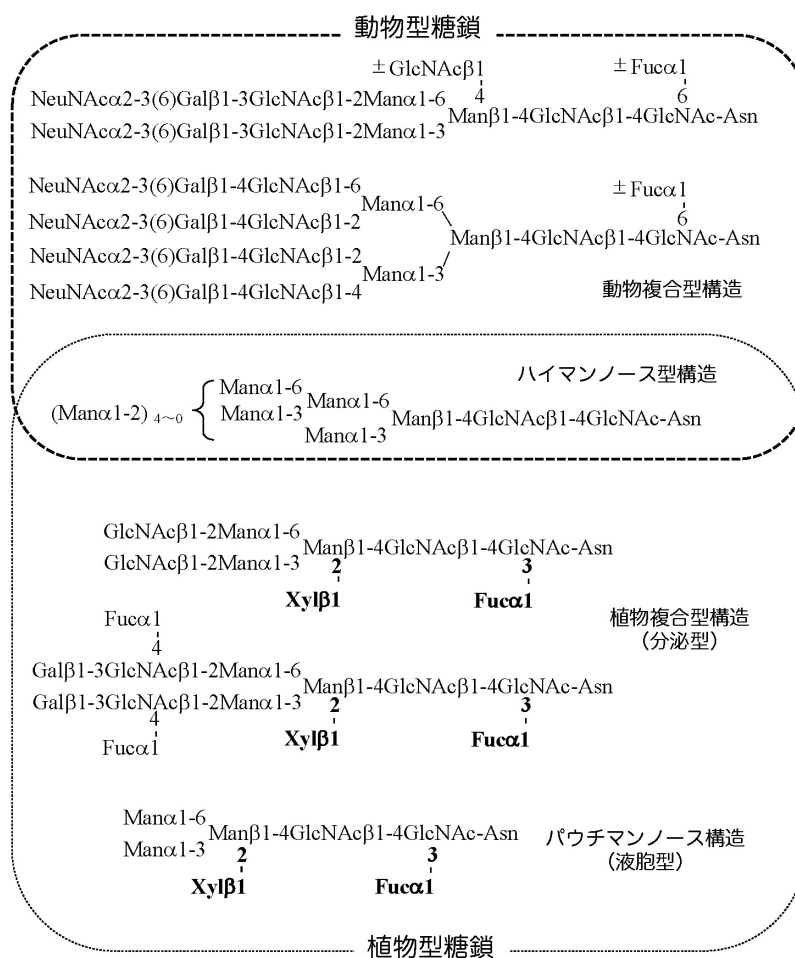


図2 動物N-グリカンと植物N-グリカンの構造比較

Asn, アスパラギン; Fuc, フコース; Gal, ガラクトース; GlcNAc, N-アセチルグルコサミン;
Man, マンノース; NeuNAc, N-アセチルノイラミン酸（シアル酸）; Xyl, キシロース

3. 植物N-グリカンの生合成機構

植物N-グリカンの抗原性を化学構造から理解するために、まず植物糖タンパク質糖鎖の生合成とプロセッシング機構を簡単に紹介する（図3）。N-グリカンは小胞体内腔でグルコース（Glc）残基を3分子有するハイマンノース型糖鎖-脂質中間体（Glc3Man9GlcNAc2-ドリコールリン酸）として組み立てられた後、合成途中でポリペプチド鎖に現れるコンセンサス配列（-Asn-X-Ser/Thr）中のAsn 残基

に“ひとかたまり (en bloc)”で転移される。その後、2分子のGlc残基が除去されて非還元末端に現れる α 1-3 Glc残基を認識するシャペロン分子の介添えによりタンパク質フォールディング（立体構造構築）が小胞体中で進行し、フォールディングの完了とともにGlc残基と1分子のMan 残基の除去が行われる。タンパク質の正常な立体構造構築に糖鎖が関与する見事な生物システムである。ここまでの過程は動植物間で共通であるが、正常にフォールディングした糖タンパク質がゴルジ装置へ配送された後に起こる糖鎖修飾（プロセッシング）過程に動植物間で違いが現れる。高等植物ではゴルジ装置中で、 β 1-2 Xyl、 α 1-3 Fuc 残基の付加とLe^a 抗原の組み立てが行われ、植物特徴的なN-グリカン、すなわち植物複合型N-グリカン（抗原性N-グリカン）が構築される^{14,15}。細胞膜あるいは細胞外（細胞壁、アポプラスト領域）へ輸送される糖タンパク質は、ゴルジ装置中で形成されたLe^a 抗原含有の複合型構造（図2）を保ったまま、細胞膜やアポプラストでそれぞれのタンパク質機能を発揮する。このLe^a抗原は、動物細胞では細胞間認識などで重要なリガンドとして機能しているが、植物における生理的意義は不明である。ミラクルフルーツに含まれ酸味を甘みに変えるタンパク質（ミラクリン）¹⁶や糖タンパク質性の花粉アレルゲン（ペクチン分解酵素やセルラーゼ活性を有する）は、Le^a 抗原含有N-グリカンが結合している。一方、液胞あるいはプロテインボディー中で機能する（あるいは貯蔵される）糖タンパク質に結合するN-グリカンは、一旦形成されたLe^a 抗原含有構造が数種のグリコシダーゼによりトリミングを受け、パウチマンノース型あるいはトランケート型と呼ばれる比較的短い構造へと収束する。実際、種子貯蔵糖タンパク質は、このトランケート型構造のN-グリカンを有する割合が圧倒的に高い^{4-6,17,18}。従って食用種子に含まれるアレルゲン（ピーナツアレルゲン（Ara h 1）、大豆アレルゲン（Gly m Bd 28K）、小麦アレルゲン（Tri a Bd 17K）などにはこのタイプの糖鎖が結合している場合が多い⁴⁻⁶。パイナップルに含まれるプロテアーゼであるブロメラインもトランケート型の抗原性糖鎖を有している¹⁹。

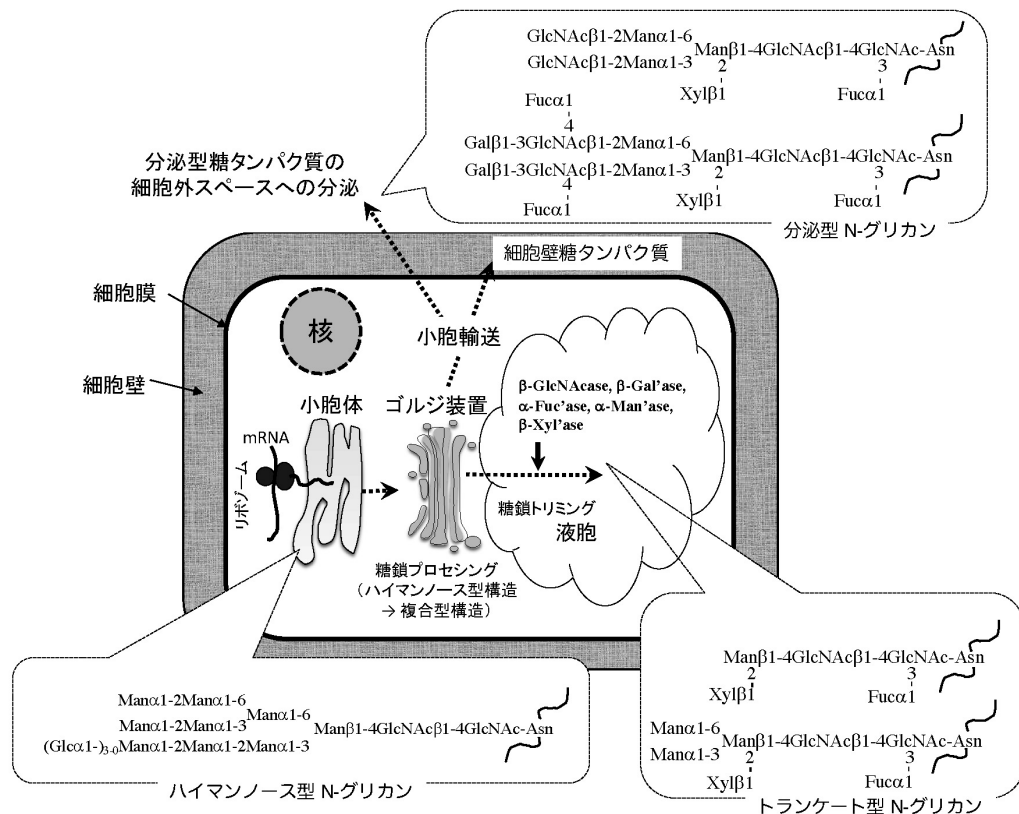


図3 植物糖タンパク質糖鎖（N-グリカン）のプロセッシング機構（文献14から引用）

4. 植物抗原性N-グリカンのアレルゲン性と免疫活性

(1) 植物N-グリカンはIgEのエピトープになりうるか？

Fayeらは^{20, 21)}、植物N-グリカンに遍在する β 1-2結合キシロースと α 1-3結合フコースが強力な抗原性を示し、哺乳動物がそれら糖鎖に対する抗体(IgGやIgM)を産生することを示した。食品アレルギー患者や花粉症患者のIgEが植物糖タンパク質や糖ペプチドに交差性を示すとの報告が相次ぐに従い、植物複合型N-グリカンこそがIgEのエピトープであると考えられるようになった²²⁻²⁴⁾。Gomezらは、小麦粉アレルギー(Baker's asthma)患者血清中のIgEがダイズ、エンドウ、インゲン種子中の貯蔵糖タンパク質を認識することを示した²⁵⁾。植物抗原性糖鎖を合成できないアラビドプシス変異株が産生する糖タンパク質は患者IgEに認識されなくなることからIgEエピトープは植物複合型N-グリカンであると考えられた²²⁾。辻らも、糖鎖付加が起こらない大腸菌で発現させたダイズ種子アレルゲン(Gly m Bd28K)がダイズアレルギー患者のIgEとは結合しなくなることを見だし、抗原性N-グリカンはアレルゲンとIgEとの結合に寄与することを報告した²⁶⁾。このように抗原性N-グリカンとIgEとの結合性が次々と報告されるようになり、IgEが異なる種類の植物アレルゲンの植物抗原性糖鎖に結合することでアレルギー反応を惹起する(交差反応する)可能性が考えられたことから、これらの植物抗原性N-グリカンは交差反応性糖鎖抗原決定基(cross-reactive carbohydrate determinants, CCDs)ともよばれるようになった。しかしながらその一方で、植物抗原性N-グリカンはIgEのエピトープとは成り得るが、臨床症状と抗原性N-グリカンに対するIgE抗体の有無には有意な相関が見られず、一価の抗原性糖鎖を持つ植物糖タンパク質はヒスタミン遊離を惹起できないことが報告されるようになった^{11, 27)}。つまり、植物複合型N-グリカンを認識するアレルギー患者のIgE抗体は、必ずしもアレルギー症状には関係しないと解釈できる。

このように抗原性N-グリカン自身がIgEの直接のエピトープであるか否かについては、糖鎖のみを用いての解析が困難であったため、議論の収束が見られなかった。そこで岡野らは、抗原性糖鎖自身が花粉アレルギー患者IgEのエピトープであるか否かを、蛍光標識した遊離型N-グリカン(Man9GlcNAc2 (M9)、Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2 (M3FX)、GlcNAc2Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2 (GN2M3FX))ライブラリーを用いて阻害ELISA法で検定した²⁸⁾。その結果、多くの患者IgEとCry j 1との結合は、遊離型抗原性N-グリカン(M3FXやGN2M3FX)を添加しても、非抗原性糖鎖(M9)の添加と同様に特異的な阻害を受けないことが明らかになった。すなわち、抗原性N-グリカン自身では、花粉症患者IgEに対するメジャーなエピトープにはならないことを示唆するものである。しかしながら、40名の患者血清のうち4名の患者血清については、抗原性糖鎖の添加により20数パーセント程度の結合阻害が見られたことから、患者によっては抗原性糖鎖がIgEに対するエピトープになる場合があることが分かった。小川ら^{29, 30)}はスギ花粉アレルゲン(Cry j 1)の花粉症患者IgEに対する直接のエピトープは糖鎖自身ではなく、抗体との結合には糖鎖の存在により構築される立体構造が重要であると指摘している。また、ピーナツアレルゲン(Ara h 1)に結合する抗原性N-グリカン(Man4-3Xyl1GlcNAc2)についても、これらの糖鎖を酵素的に除去すると一部のアレルギー患者IgEの結合性が消失することから、ピーナツアレルギーにおいても抗原性N-グリカンあるいは糖鎖を含めたポリペプチド部位の立体構造をエピトープとするIgEが存在することが確認されている⁶⁾。

そして現在(2010年代以降)では、血清中の植物抗原性N-グリカンを認識するIgEの存在が食物アレルギーや花粉症の診断において擬陽性を与える懸念があり、抗原性N-グリカン反応性のIgEを予め除去した後にアレルゲンと血清中のIgEとの結合性を解析する手法がアレルギー診断に用いられている。しかしながら、少数のアレルギー患者で検出されるに過ぎないが、抗原性N-グリカンがIgEの産生を誘導することは事実であり、これらのIgEの産生機構やその存在意義に興味がもたれる。

(2) 植物抗原性N-グリカンのTh2細胞に対する作用

Cry j 1で花粉症患者由来のTh2細胞を刺激するとインターロイキン4(IL-4)が産生される。このIL-4がB細胞を活性化させIgE等の抗体産生を引き起こし、引いてはアレルギー疾患を誘発するに至

る。これまでは、植物N-グリカンがスギ花粉症患者IgEに対する主要なエピトープと成りうるか否かの論議が中心であったが、岡野らは遊離型の抗原性N-グリカン（M3FX）と非抗原性糖鎖（Man9GlcNAc2）を用いて、抗原性及び非抗原性N-グリカンのT細胞のサイトカイン産生に及ぼす生理活性についての検定を行っている²⁸⁾。その結果、花粉症患者由来Th2細胞をCry j 1と共に μ M濃度のM3FXで培養すると、T細胞増殖を有意に抑制し、Cry j 1単独刺激でみられたIL-4産生も有意に抑制された（図4）。しかしながら、Cry j 1による刺激がなければTh2細胞のIL-4分泌を抑制することはなかった。更に、遊離型抗原性N-グリカンに対するTh1細胞の応答についても調べた結果、M3FXはTh1細胞のインターフェロン γ （INF- γ ）の産生には有意な影響を与えることもなかった。この結果は、花粉症患者が花粉アレルゲンと接触する際にT細胞（Th2細胞）をM3FXで処理すれば、アレルギー疾患の引き金となるIgE産生を抑制することが可能であることを示唆している。従ってこの知見は、抗原性N-グリカンのTh2細胞シグナル伝達に関わる新たな生理活性の発見であるとともに、（実際の臨床使用に向けては様々な問題点を解決する必要があるが）花粉症治療に向けた糖鎖薬剤開発の可能性を示唆するものと思われる。もし、植物N-グリカンが直接Th2細胞に作用するならば、細胞表面に植物糖鎖に特異的なレセプター分子が存在することも考えられる。今後、植物N-グリカンのIL4産生抑制活性に関わる分子機構を明らかにする上でも、それらTh2細胞表面に存在すると考えられるレクチン様レセプター分子の同定と分子特性、そして関与するシグナル伝達機構の解析が必要であろう。この点に関して、筆者らは納豆の成分としても知られている γ -ポリグルタミン酸（ γ PGA）を担体としてハイマンノース型糖鎖、植物複合型糖鎖（抗原性糖鎖）を多価カップリングさせた人工糖鎖ポリマーの作成に成功し（図5）³¹⁾、この糖鎖ポリマーを利用した細胞表面あるいは細胞内に存在するレクチン様レセプターのスクリーニングを開始している。新しいレクチン様レセプターあるいはレクチン様キナーゼの発見に貢献できればと考えている。

Man9GlcNAc2

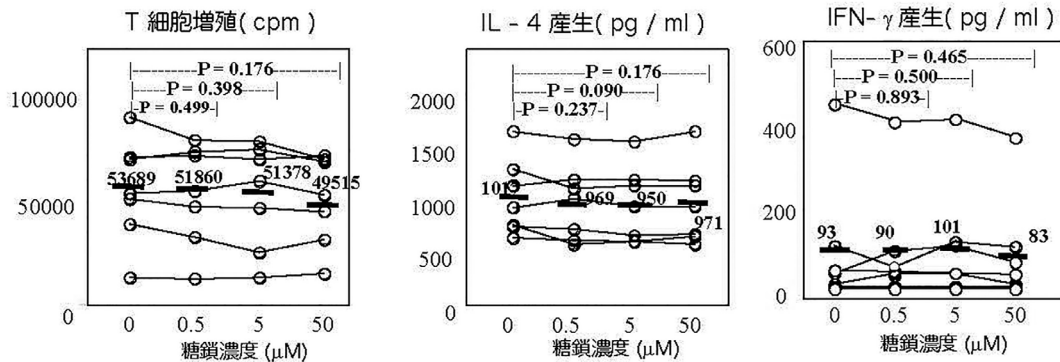


図4 遊離型抗原性N-グリカンの免疫活性（文献28 より引用改変）

IL-4, インターロイキン-4; IFN- γ , インターフェロン- γ

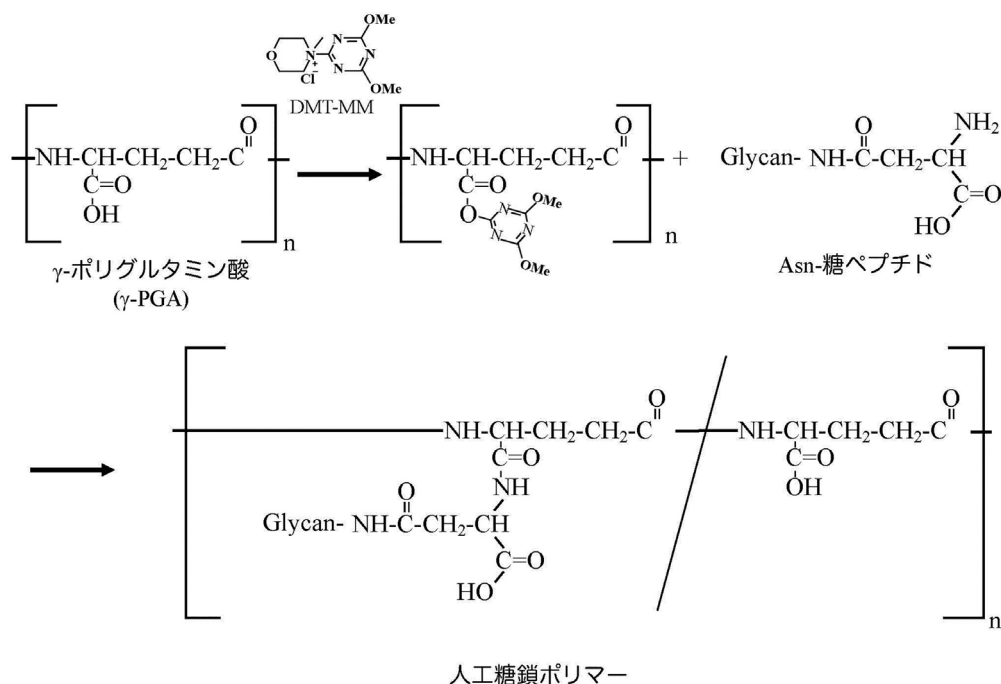


図5 抗原性糖鎖を多価カップリングさせた人工糖鎖ポリマーの合成 (文献 31から引用改変)

文献

- 1) 永井克孝: “糖鎖II, 糖鎖と病態” 東京化学同人 pp.28-39, 40-50 (1994).
- 2) 神奈木 玲児: “糖鎖生物学 – 生命現象と糖鎖情報 –” 名古屋大学出版会 pp.267 (2020).
- 3) ホートン: 生化学 (第5版) 第8章 糖質 東京化学同人, pp 209 (2013).
- 4) 辻英明: 日本栄養・食糧学会誌, 55, 191-198 (2002).
- 5) D. Kolarich, F. Altmann: *Anal. Biochem.*, 285, 64-75 (2000).
- 6) Md. Asaduzzaman, M. Maeda, T. Matsui, Y. Takasato, K. Ito, Y. Kimura: *Glycoconj. J.*, 38, 67-76 (2021).
- 7) M. Maeda, M. Kamamoto, K. Hino, S. Yamamoto, M. Kimura, M. Okano, Y. Kimura: *Biosci Biotechnol Biochem.*, 69, 1700-1705 (2005).
- 8) Y. Kimura, M. Kamamoto, M. Maeda, M. Okano, M. Yokoyama, K. Kino: *Biosci Biotechnol Biochem.*, 69, 137-144 (2005).
- 9) Y. Kimura, M. Kuroki, M. Maeda, M. Okano, M. Yokoyama, K. Kino: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 485-491 (2008).
- 10) T. Osada, M. Maeda, C. Tanabe, K. Furuta, C.J. Vavricka, E. Sasaki, M. Okano, Y. Kimura: *Carbohydr Res.*, 448, 18-23 (2017).
- 11) F. Altman: *Allergo. J. Int.*, 25, 98-105 (2016).
- 12) A. Homann, G. Schramm, J. Uta: *J. Allergy Clin. Immunol.*, 140, 356-368 (2017).
- 13) 日本小児アレルギー学会: 第3章食物アレルギー総論 食物アレルギー診療ガイドライン2021.
- 14) 木村 吉伸: 化学と生物, 64-77 (2023).
- 15) R. Strasser: *Glycobiology.*, 26, 926-939 (2016).
- 16) N. Takahashi, H. Hitotsuya, H. Hanzawa, Y. Arata, Y. Kurihara: *J. Biol. Chem.*, 265, 7793-7798 (1990).
- 17) Y. Kimura, A. Ohno, S. Takagi: *Biosci Biotechnol Biochem.*, 60, 1841-1850 (1996).
- 18) Y. Kimura, A. Ohno, S. Takagi: *Biosci Biotechnol Biochem.*, 61, 1866-1871 (1997).

- 19) H. Ishihara, N. Takahashi, S. Oguri, S. Tejima : *J. Biol. Chem.*, 254, 10714-10719 (1979).
- 20) L. Faye, M. J. Chrispeels: *Glycoconjugate, J.*, 5, 245-256 (1988).
- 21) L. Faye, V. Gomord, A.C. Fitchette-Lainé, M. J. Chrispeels: *Anal. Biochem.*, 209, 104-108 (1993).
- 22) G. Garcia-Casao, R. Sanchez-Monge, M.J. Chrispeels, A. Armentia, G. Salcedo, L. Gomez : *Glycobiology*, 6, 471-477 (1996).
- 23) I.B.H.Wilson, J.E.Harthill1, N.P.Mullin, D.A.Ashford, F. Altmann : *Glycobiology*, 8, 651-661 (1998).
- 24) E. Batanero, J.F.Crespo, R.Monsalve, M. Martin-Estevan, M.Vilalba, R. Rodriguez : *J. Allergy Clin. Immunol.*, 103, 147-153 (1999).
- 25) L. Gomez, E. Martin, D. Hernandez, R. Sanchez-Monge, D. Barber, V. del Pozo, B. de Andres, A. Armentia, C. Lahoz, G. Salcedo, P. Palomino : *FEBS Lett.*, 261, 85-88 (1990).
- 26) H. Tsuji, M. Hiemori, M. Kimoto, H. Yamashita, R. Kobatake, M. Adachi, T. Fukuda, N. Bando, M. Okita, S. Utsumi : *Biochim Biophys Acta*, 1518, 178-82 (2001).
- 27) M.J. van der Veen, R. van Ree, R.C. Aalberse, J. Akkerdaas, S.J. Koppelman, H.M. Jansen, J.S. van der Zee : *J. Allergy Clin. Immunol.*, 100, 327-334 (1997).
- 28) M. Okano, Y. Kimura, M. Maeda, F. Matsuda, Y. Michigami, M. Kimura, K. Nishizaki : *Clin. Exp. Allergy*, 34, 770-778 (2004).
- 29) H. Ueda, H. Ogawa : *Trends in Glycosci. Glycotech.*, 11, 413-426 (1999).
- 30) H. Ogawa, M. Amano, A. Hijikata, T. Kamidaira, S. Suetsugu, I. Ishituka : *J. Appl. Glycosci.*, 50, 327-331 (2003).
- 31) N. Takeda, M. Maeda, S. Itano, M. Takase, M. Kimura, Y. Kimura : *Int. J. Biol. Macromol.*, 147, 1294-1300 (2020).